Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. L. Felix Müller

ÜBER DIE HÄMOGLOBINKONZENTRATION DER ERYTHROZYTEN BEIM HUND

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Schulz

Tierarzt aus Potsdam - Babelsberg

Berlin 1965

Journal-Nr. 496

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. L. Felix Müller

ÜBER DIE HÄMOGLOBINKONZENTRATION DER ERYTHROZYTEN BEIM HUND

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rüdiger Schulz

Tierarzt aus Potsdam - Babelsberg

Berlin 1965

Journal-Nr. 496

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Priv. Doz. Dr. H. Niepage
Korreferent: Prof. Dr. L.F. Müller
Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.1965
Tag der Promotion: 2. 6. 65

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I	Einleitung	5
II	Schrifttum	6
III	Eigene Untersuchungen	
	Material und Methoden	11
	Versuche und Ergebnisse	12
IV	Besprechung	33
V	Zusammenfassung	37
VI	Literaturverzeichnis	39

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0018

E i n l e i t u n g

Die roten Blutkörperchen erfüllen als Träger des Hämoglobins im Gasstoffwechsel des Organismus eine lebenswichtige Aufgabe.Das Erythrozytensystem ist namentlich wegen des komplizierten Aufbaus des Hämoglobinmoleküls für Schädigungen anfällig.Daher gehört die Überprüfung dieses Systems zur Routine der klinischen Untersuchung.
Die Zählung der Erythrozyten und die Bestimmung des Hämoglobingehaltes ermöglichen es, einen Schluß auf den Durchschnittsgehalt des einzelnen Erythrozyten an Hämoglobin zu ziehen.
In der Humanmedizin wird dazu vielfach der sogenannte Färbeindex verwendet.Für veterinärmedizinische Zwecke ist der Färbeindex wenig geeignet,da er Bezug auf den normalen Wert des Menschen nimmt,der für die Tiere ohne Bedeutung ist. Nützlicher ist es,den Hämoglobingehalt des Durchschnittserythrozyten in Gramm anzugeben(Hb_E-Wert).Im angelsächsischen Schrifttum wird dieser Wert als MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin) bezeichnet.Dieser Wert wird vielfach zur Klassifizierung von Anämien verwendet,die man nach dem durchschnittlichen Hämoglobingehalt des einzelnen roten Blutkörperchens in farbstoffarme (hypochrome) und farbstoffreiche (hyperchrome) Anämien unterteilen kann.
Es hat sich gezeigt,daß die Farbstoffmenge des Erythrozyten eng mit seiner Größe korreliert ist.Große Erythrozyten enthalten in der Regel auch eine absolut große Menge Hämoglobin,kleine Erythrozyten wenig.Daraus folgt,daß die Farbintensität eines Erythrozyten durch den MCH-Wert nicht ausgedrückt wird.Ein großer,relativ blasser Erythrozyt kann absolut mehr Hämoglobin enthalten als ein kleiner,der kräftig gefärbt erscheint.Zur Feststellung des auf das Volumen des Erythrozyten bezogenen Farbstoffgehaltes muß die Hämatokritbestimmung in die Blutuntersuchung einbezogen werden. Kennt man in einer Blutmenge das Gesamtvolumen der Erythrozyten und ihren Hämoglobingehalt,so können beide Werte miteinander in Beziehung gesetzt werden.Die Division des Hämo-

globinwertes durch den Hämatokritwert mit 100 multipliziert ergibt die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, den sogenannten MCHC-Wert (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration). Er gibt an,wieviel Gramm Hämoglobin pro 100ml Erythrozyten vorhanden sind.Während der MCH-Wert lediglich die absolute Menge an Farbstoff angibt,die das durchschnittliche rote Blutkörperchen enthält, gibt der MCHC-Wert den relativen Farbstoffreichtum der Erythrozyten an.Er ist daher ein Maß für die Farbintensität der roten Blutkörperchen.

Der Farbstoffreichtum der Erythrozyten,auf auf sein Volumen bezogen,ist zugleich bestimmend für sein Gewicht.Erythrozytenstromata sind leicht,von gleichgroßen Erythrozyten ist das hämoglobinreichere das schwerere.Es war das eigentliche Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob sich der MCHC-Wert als Maß für das spezifische Gewicht der Erythrozyten praktisch ausnutzen läßt.

Nach dem Zentrifugieren des ungerinnbar gemachten Blutes im Hämatokritröhrchen erscheint die Erythrozytensäule,abgesehen von der obersten Schicht,gleichmäßig rot.Es sollte über den MCHC-Wert geprüft werden,ob die Erythrozytensäule aus roten Blutkörperchen unterschiedlichen spezifischen Gewichtes zusammengesetzt ist. Dazu mußte nach dem Zentrifugieren des Blutes das Plasma abgehoben und die Erythrozytensäule in einzelne Schichten aufgeteilt werden. Durch Zusatz des bluteigenen Plasmas war aus jeder Schicht eine besondere Blutprobe herzustellen,die zur Berechnung des MCHC-Wertes Verwendung finden sollte.

Die ersten orientierenden Versuche verliefen völlig unbefriedigend,weil sich zeigte,daß die MCHC-Werte enorm streuten. Es wurde deshalb eine systematische Prüfung der Faktoren vorgenommen,die auf das Ergebnis der MCHC-Bestimmung von Einfluß sein können.

S c h r i f t t u m

Die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration wird aus dem Ergebnis der Hämoglobinbestimmung und dem Hämatokritwert berechnet.Die Fehler beider Verfahren gehen demnach in den MCHC-Wert ein. Literaturhinweise über die Fehler-

breite von Methoden können nicht direkt übernommen werden, sondern müssen im eigenen Arbeitsbereich geprüft werden.Es ist jedoch von Nutzen,die Literatur nach prinzipiell erkannten Fehlerquellen der einzelnen Methoden durchzusehen.

Zur Bestimmung des Hämoglobingehaltes stellten KWIATKOWSKI und ROGOWSKA (1962) fest,daß die Methode nach SAHLI die ungenauesten und im Vergleich zur Cyanhämiglobinmethode etwa um 1,7% niedrigere Werte liefert. RICHERT (1962) gibt für die Hämoglobinbestimmung an Rinderblut Standardabweichungen von drei Methoden an:

Unicam-Spektralphotometer	$\bar{x}_s = \pm$ 0,11	g%(Cyanhämiglobin)
ZEISS-Hämoglobinometer	$\bar{x}_s = \pm$ 0,34	g%(salzsaures Hämatin)
SAHLI- "	$\bar{x}_s = \pm$ 0,44	g% "

Von den verschiedenen Methoden zur Hämoglobinbestimmung hat sich die Messung als Cyanhämiglobin durchgesetzt und gibt nach Übereinstimmung aller Autoren die zuverlässigsten Werte,weil der dabei entstehende Farbstoff sehr stabil ist. Das Verfahren wurde auch bei dieser Arbeit angewendet.Fehler durch die verwendeten Pipetten und die Ableseungenauigkeit am Photometer sind schwer vermeidbar.

Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Hämatokritbestimmung.Die Bezeichnung Hämatokrit geht auf HEDIN (1895) zurück,der die ersten Versuche zur Zentrifugierung ungerinnbar gemachten Blutes in einer Thermometerkapillare bekannt gab.

Das HEDINsche Verfahren fand zunächst keinen Eingang in die Routinemethodik,da es sich als technisch schwierig erwies,einen zuverlässigen Kapillarverschluß herzustellen. Später wurden verschiedene Verfahren zur Bestimmung des sogenannten Mikrohämatokrit angegeben.Größere Verbreitung gewann das Hämatokritverfahren erst,als von Amerika aus das sogenannte Makroverfahren bekannt wurde(WINTROBE,1929).

Beim Hämatokritverfahren kommt es darauf an,das Blut so lange und mit so hoher Umdrehungsgeschwindigkeit zu zentrifugieren,daß die Erythrozyten eine größtmögliche Kompression erfahren,ohne dabei zerstört zu werden.Nur in diesem Falle kann die Erythrozytensäule im Hämatokritröhrchen dem Gesamtvolumen der in der Blutprobe vorhandenen

roten Blutkörperchen praktisch gleichgesetzt werden.Das Ausmaß der Kompression der Erythrozyten hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Winkelgeschwindigkeit der verwendeten Zentrifuge und die Dauer der Zentrifugation lassen sich exakt angeben. Ihr Einfluß auf den Hämatokritwert ist durch Versuche einfach zubestimmen.Schwieriger ist die Frage nach dem Einfluß des Rotationsabstandes zu beantworten. Der Abstand der Erythrozyten vom Rotationsmittelpunkt ändert sich während des Schleuderns und ist bis zuletzt nicht für alle roten Blutkörperchen gleich groß. Die begrenzte Widerstandsfähigkeit der Erythrozyten setzt der Zentrifugation gewisse Grenzen. Auch im günstigsten Fall läßt es sich nicht erreichen,die Erythrozyten vollkommen plasmafrei zu massieren. Eine bestimmte Menge Plasma bleibt immer innerhalb der Erythrozytensäule erhalten.Im angelsächsischen Schrifttum wird diese Plasmamenge als „trapped plasma" bezeichnet. Aus der Humanmedizin liegen mehrere Untersuchungen über das „trapped plasma" vor.Den größten Einfluß übt die Umdrehungszeit aus. Der Radius spielt dazu im Verhältnis eine untergeordnete Rolle (HEAD und HOLMES, 1953).
CHAPLIN und MOLLISON (1952) geben Standardwerte für das „trapped plasma" bei einem Hämatokritwert von 45% ,der unter Standardbedingungen (3000 U/Min., r=15 cm bis zum Boden des Hämatokritröhrchens) ermittelt wurde:
bei Menschenblut beträgt das „trapped plasma" nach 30 Minuten 4,35 %, nach 55 Minuten 2,50 %. Die Streuung der Werte wird nach längerem Zentrifugieren geringer. LEESON und REEVE (1951) geben die Extremwerte für das „trapped plasma" mit 2,2 bis 8,5% an,die auch bei größerer Zentrifugalkraft und doppelter Drehzeit auftreten.Sie führen die extremen Werte auf die Ungenauigkeit der Messungen zurück.In der Regel liegen die Werte bei heparinierten Menschenblut zwischen 4 und 5 %.
EBAUGH, LEVINE und EMERSON (1955) befaßten sich mit der Untersuchung des „trapped plasma" bei verschieden hohen Hämatokritwerten und geben im einzelnen an:

0,8%	oder weniger	„trapped plasma"	bei Hämatokrit	40
2,0%	"	"	"	50
4,0%	"	"	"	68

Unter 30% Hämatokrit fanden sie keinen nennenswerten Betrag an „trapped plasma".
Im veterinärmedizinischen Schrifttum liegen nur wenige Angaben über das „trapped plasma" vor.
LEESON und REEVE (1951) bestimmten die Verteilung des „trapped plasma" im Hämatokrit des Kaninchenblutes und fanden 2,8% im unteren Drittel und 4,1% in den beiden oberen der Erythrozytensäule.
Für den Hund konnte nur eine Literaturangabe von BILLINGS und BROWN (1955) gefunden werden,die 5% angeben.Für das „trapped plasma" beim Schaf gibt SCHALM (1961) 5%,für Rinderblut 6% an.
Es hat sich auch gezeigt,daß neben Zentrifugierungszeit, Umdrehungsgeschwindigkeit und Rotationsabstand die Qualität der Hämatokritröhrchen einen Einfluß auf das Ergebnis des Hämatokrit ausübt.
So untersuchten LEESON und REEVE (1951) den Hämatokrit von Menschen- und Kaninchenblut mit Hämatokritröhrchen unterschiedlichen Durchmessers bei einer Blutsäule von 100 mm bei 3000 U/Min. und 30 Minuten Dauer der Zentrifugierung. Bei Menschenblut zeigte sich eine gute Übereinstimmung des Hämatokrit zwischen Röhrchen mit einem inneren Durchmesser von 3 und 9 mm. Die Werte lagen aber durchschnittlich um 0,4% höher als bei Röhrchen mit einer 1 mm Bohrung.Die Differenz im Hämatokrit bei den Röhrchen mit 1 mm und 9 mm Durchmesser betrug etwa 0,55%.
Hinsichtlich der Unterschiede zwischen dem WINTROBE-Hämatokrit, bei dem eine Blutsäule von 100 mm und dickwandige Röhrchen mit einem Lumen von 2,5 mm verwendet werden, und dem Mikrohämatokrit wurden von STRUMIA,SAMPLE und HART(1954) Untersuchungen angestellt.Es wurden Kapillaren mit 0,6 mm Durchmesser und einer Blutsäule von etwa 25 mm bei 28000 U/Min. (r=3,6 cm) für eine Minute zentrifugiert.Es zeigte sich,daß der Hämatokrit etwa 2,2% niedriger lag als bei dem Verfahren nach WINTROBE. In einem weiteren Versuch wurden Kapillaren und WINTROBE-Röhrchen bei 3000 U/Min. und 30 Min. zentrifugiert. Dabei lag der Mikrohämatokrit um durchschnittlich 1% niedriger als der Makrohämatokrit.

DEUBLER und COLE (1957) prüften Hundeblut mit Präzisionskapillaren (32 mm x 0,8 mm) und zentrifugierten bei 16000 U/Min. für zwei Minuten. Die Ergebnisse lagen 2-5% unter dem WINTROBE-Hämatokrit.
Das „trapped plasma" im Mikrohämatokrit ist nach Meinung von STRUMIA, SAMPLE und HART (1954) so gering, daß es für praktische Zwecke vernachlässigt werden darf.
Ferner sind Einflüsse auf den Hämatokritwert zu nennen, die ihre Ursache in den osmotischen Eigenschaften der Erythrozyten haben. Eine Flüssigkeitsaufnahme durch die roten Blutkörperchen führt zur Volumenzunahme und damit zu einem vergrößerten Hämatokritwert, Wasserabgabe bewirkt das Gegenteil. Die verwendeten Antikoagulantien und die Temperatur wirken auf das osmotische Verhalten der Erythrozyten ein.
Zur Verhinderung der Blutgerinnung wird heute vielfach Heparin, Doppeltoxalat nach HELLER und PAUL oder EDTA den Proben zugesetzt. Für die osmotischen Veränderungen der Erythrozyten und damit für das Zell-Plasma-Verhältnis ist die Art der gewählten Antikoagulantien und deren Konzentration von Bedeutung. Untersuchungen von HELLER und PAUL (1934) zeigen, daß sich der Hämatokritwert bei der Verwendung von K-NH_4-Oxalat und Di-K-EDTA nicht signifikant verändert (die Differenz beträgt etwa 0,08). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen HADLEY und WEISS (1955). Wird Di-NH_4-EDTA verwendet, so steigt der Hämatokritwert um 0,86. SCHALM (1961) und WINTROBE (1941) sehen bei der Verwendung von Heparin keine Änderung im Volumen der Erythrozyten. HELLER und PAUL (1934) zeigten jedoch, daß bei einer Steigerung der Heparinkonzentration pro 1 ml Rattenblut von 0,1 mg auf 0,4 mg der Hämatokritwert um etwa 2,3% abnimmt. Der ständige Flüssigkeitsaustausch zwischen den Erythrozyten und dem sie umgebenden Plasma wird nicht nur durch die Ionenverhältnisse, sondern auch durch die Temperatur beeinflußt. OLMSTEAD (1960) variierte die Bluttemperatur und stellte fest, daß bei 4°C der Wasserausfluß aus den Erythrozyten im Vergleich zu einer Temperatur von 38°C steigt. Bei Temperaturerhöhung auf 45°C nehmen die Erythrozyten Wasser auf.
Über die Folgen, die die genannten Einflüsse auf den MCHC-Wert haben, konnten keine Angaben gefunden werden.

In der neueren humanmedizinischen Literatur werden Angaben über die Differenzierung der Anämie mit Hilfe des MCHC-Wertes gemacht. WINTROBE (1963) sieht bei der mikrozytären Anämie MCHC-Werte unter 30%. Bei den normozytären Anämien liegt der MCHC-Wert im Normalbereich. BEGEMANN und HARWERTH (1959) geben bei den hypochromen Anämien MCHC-Werte an, die 30% nicht überschreiten.
Im veterinärmedizinischen Schrifttum gibt SCHALM (1961) für die hypochromen Anämien niedrige MCHC-Werte an. Er bezweifelt die Existenz hyperchromer Anämien, da er nicht beobachten konnte, daß der MCHC-Wert signifikant über den Normalwert steigt. Für den Hund liegt der Normalwert zwischen 31 und 34 %.
Bei roten Blutkörperchen kann nach SCHALM der MCHC-Wert nicht über 35% steigen.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

A Material und Methoden

Das Blut für unsere Untersuchungen stammte von 10 klinikeigenen Hunden und einer Reihe poliklinischer Patienten. Da es für die Fragestellung der Arbeit nicht auf die klinischen Daten der verwendeten Tiere ankam, wird auf die Wiedergabe von Krankengeschichten verzichtet.
Die Hämoglobinbestimmung wurde nach der Cyanhämiglobinmethode (BETKE und SAVELSBERG) durchgeführt. Die Lösungen wurden mit dem Photometer „Eppendorf" ausgewertet.
Für die Untersuchung der kleinen Blutproben, die sich aus den Hämatokritschichten herstellen ließen, erschien die Verwendung einer Mikrohämatokritmethode als besonders geeignet. Sie wurde in verschiedener Weise durchgeführt, die bei den einzelnen Versuchen näher dargestellt ist.
Als Makrohämatokritmethode diente das Verfahren nach WINTROBE.
Für die Hämatokritbestimmung wurden die Röhrchen 30 Minuten bei 2400 U/Min. und einem Radius r=14,5 ch (bis zum Boden der Hämatokritröhrchen) zentrifugiert. In einigen Fällen wurde die Gefrierpunktserniedrigung des Plasmas bestimmt.

Es kam die Apparatur nach BECKMANN zur Anwendung. Das Kryoskop wurde gegen die Zimmertemperatur gut isoliert, um die Umgebungstemperatur des zu prüfenden Plasmas möglichst lange bei -10 bis -12°C zu halten. Die Korrektur der gemessenen Gefrierpunktserniedrigung wurde mit der von COLLINS und SCOTT (1932) angegebenen Formel durchgeführt:

$$\Delta = \Delta' - 0{,}01582 \; u \; \Delta'$$

Δ = wahrer Gefrierpunkt
Δ' = gemessener Gefrierpunkt
u = Konvergenzpunkt (die Temperatur in °C, bei der die Erstarrung der zu prüfenden Flüssigkeit beginnt und die Quecksilbersäule plötzlich steigt)

B Versuche und Ergebnisse

1. Fehlerberechnung der Hämoglobinbestimmungsmethode

Für die Untersuchung des methodischen Fehlers bei der Hämoglobinbestimmung wurden geeichte Pipetten zur Abmessung der Transformationslösung und der Blutproben verwendet. Die Zehnfachbestimmung des Hämoglobinwertes eines Blutes ergab bei einem Mittelwert von $\bar{x}$ = 20,7 g% eine Standardabweichung von s = $\pm$ 0,32. Dagegen wurde aus zwölffacher Bestimmung einer Blutprobe mit dem Mittelwert $\bar{x}$ = 1,66 g% eine Standardabweichung von s = $\pm$ 0,027 gefunden. Der Fehler war bei der hämoglobinarmen Blutprobe absolut geringer als bei der Probe mit dem höheren Hämoglobingehalt. Der Vergleich der Variabilitätskoeffizienten, die v = 1,55 bzw. v = 1,63 betrugen, zeigt jedoch, daß der Fehler im Verhältnis zum Mittelwert in beiden Fällen etwa gleich groß war.

2. Fehlerbestimmung der Mikrohämatokritmethode

Für die Durchführung des Mikrohämatokrit wurden aus dem Handel bezogene Schmelzkapillaren von 11 cm Länge benutzt. Der unter dem Mikroskop mit dem Okularschraubenmikrometer bestimmte innere Durchmesser variierte zwischen 0,35 und 0,54 mm. Das Blut wurde in die Kapillaren aufgezogen, die danach mit Hilfe einer kleingestellten Gasflamme einseitig zugeschmolzen wurden. Nach dem Zentrifugieren wurde mit Hilfe eines Lineals die Gesamtlänge der Blutsäule sowie die

Länge der Erythrozytensäule abgemessen und der Hämatokritwert durch Teilung der Länge der Erythrozytensäule durch die Gesamtblutsäule errechnet.

Die gleichzeitige Zentrifugierung(3400 U/Min.,30 Minuten) eines Blutes in sieben wahllos herausgegriffenen Schmelzröhrchen der genannten Art ergab:

Tabelle 1

Blutsäule(mm)	Erythrozytensäule(mm)	Hämatokrit
94,0	49,8	53,0
67,0	38,0	56,7
82,0	46,0	56,1
92,0	50,5	54,9
87,0	48,0	55,2
78,0	44,5	57,1
87,5	41,3	47,2

$\bar{x} = 54,3 \pm 3,42$

In dem beschriebenen Versuch variierte die Länge der Blutsäule in den einzelnen Kapillaren beträchtlich.In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß der Länge der Blutsäule auf das Ergebnis des Hämatokritwertes geprüft.

Vom Blut des gleichen Hundes wurden zwei Serien zu je fünf kapillaren angesetzt, von denen die eine Blutsäulen von 91,1 bis 98,0 mm, die andere Blutsäulen von 98,2 bis 100,0 mm enthielt.

Nach Beendigung der Zentrifugierung ergab sich für die Gruppe mit den kürzeren Blutsäulen $\bar{x} = 54,5 \pm 1,41$. Für die Gruppe mit den längeren Blutsäulen $\bar{x} = 56,8 \pm 0,74$. Die Differenz der Mittelwerte ist signifikant ($p < 0,002$).

In einem weiteren Versuch wurden 16 Kapillaren mit dem Blut des gleichen Hundes unterschiedlich hoch gefüllt und gleichzeitig zentrifugiert.

Tabelle 2

Blutsäule(mm)	Hämatokrit	Blutsäule(mm)	Hämatokrit
46,0	46,7	81,5	51,5
55,0	43,6	82,0	51,2
57,0	48,2	84,0	55,3
67,0	53,7	86,0	58,3
71,5	51,0	95,0	54,1
75,0	51,3	95,5	55,4
78,5	53,5	100,1	55,7
81,0	50,6	100,2	55,8

Die Darstellung der Ergebnisse in einem Koordinatennetz, das die Länge der Blutsäule in Beziehung zum Hämatokritwert setzt, zeigt, daß die 16 Punkte eine mit der Zunahme der Blutsäule steigende Tendenz besitzen.

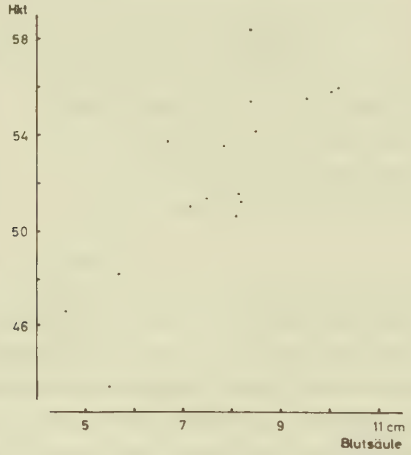

Abbildung 1 Einfluß der Blutsäule auf den Hämatokritwert eines Blutes (Mikrohämatokrit)

Die folgenden Versuche prüfen den Einfluß der Zentrifugationszeit auf das Ergebnis des Mikrohämatokrits.
16 Kapillaren, gefüllt mit dem Blut eines Hundes, wurden 30 und 60 Minuten bei 2400 U/Min. zentrifugiert.
Ergebnis: $\bar{x} = 52,2 \pm 3,8$ nach 30 Minuten
$\bar{x} = 51,8 \pm 4,0$ " 60 Minuten
Die Differenz erwies sich als nicht signifikant.
In einem besonderen Versuch wurde die Mikrohämatokritbestimmung mit Kapillaren von 4,5 cm Länge und einem Durchmesser von 0,65 mm bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 10 000 U/Min. in einer Drehzeit von 5 Minuten durchgeführt. Es wurde dabei auf möglichst gleich hohe Blutfüllung geachtet.

Tabelle 3

Blutsäule(mm)	Erythrozytensäule(mm)	Hämatokrit
39,9	18,4	46,1
39,5	18,8	47,6
39,4	18,4	46,7
39,0	18,0	46,2
38,2	17,8	46,6
38,1	17,6	46,2
37,5	16,6	44,3
36,8	16,5	44,8

$\bar{x} = 46,1 \pm 1,06$

Es zeigte sich,daß die Standardabweichung nicht geringer ausfiel als bei der vorher angewandten Methode.Sie ist ebenfalls zu hoch,um Hämatokritwerte zu liefern,die für die Berechnung des MCHC-Wertes zuverlässig genug sind. Selbst bei größtmöglicher Angleichung der Proben in bezug auf die Länge zeigt sich auch in diesem versuch eine deutliche Abhängigkeit des Hämatokritwertes von dieser.

Überblickt man die Ergebnisse der Versuche,die zum Ziel hatten,die Ursache für die relativ große Standardabweichung zu prüfen,so ist festzustellen:
Die Standardabweichung läßt sich einschränken,wenn dafür gesorgt ist,daß die Blutsäulen in den Kapillaren jeweils gleich lang sind.Es ist technisch schwierig,an Kapillarröhrchen,die,wie die verwendeten Schmelzkapillaren, keine Mensur haben,eine genaue Einstellung vorzunehmen.
Die übrigen auf den Hämatokritwert Einfluß nehmenden Größen,wie die Geschwindigkeit der Umdrehung, der Abstand vom Rotationsmittelpunkt und die Zeitdauer der Zentrifugation lassen sich leicht standardisieren.
Die entscheidende Fehlerquelle bleibt die unterschiedliche Länge der Blutsäule.Auch bei größter Sorgfalt ließ sich unter den gegebenen Umständen die Standardabweichung nicht unter 0,7% senken.
Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb das Mikrohämatokritverfahren nicht angewandt.

3. Fehlerbestimmung des Hämatokritverfahrens nach WINTROBE

Entsprechend den Untersuchungen mit dem Mikrohämatokrit wurde auch das Makroverfahren nach WINTROBE einer Prüfung

in bezug auf die Fehlerbreite unterzogen. Die Mehrfachuntersuchung einer Blutprobe nach dem Makroverfahren ergab in zwei Versuchen:

1) $\bar{x}$ = 57,8 ± 0,34 n = 10
2) $\bar{x}$ = 54,9 ± 0,32 n = 4

Die Standardabweichung liegt beträchtlich unter der des Mikroverfahrens.
Für ein Blut mit niedrigem Hämatokritwert ergab sich

$\bar{x}$ = 4,9 ± 0,16 n = 12.

Absolut nimmt also die Streuung mit der Größe des Hämatokritwertes ab. Der Vergleich der Variabilitätskoeffizienten zeigt jedoch für den Hämatokrit eine deutliche Zunahme bei niedrigem Hämatokritwert. In den ersten Versuchen ergab sich v = 0,59 bzw. v = 0,55, im zweiten Versuch dagegen v = 3,2.
Daraus geht hervor, daß die Ergebnisse unsicherer werden, wenn ein Blut mit geringem Hämatokrit untersucht wird, wie es z.B. bei Anämien die Regel ist.
Die Absicht, die Bestimmung des MCHC-Wertes an kleinen Blutproben, die aus den aufeinanderfolgenden Schichten des Hämatokrit gewonnen werden sollten, durchzuführen, ließ erwarten, daß die zur Verfügung stehende Blutmenge nicht immer ausreichen würde, um ein WINTROBE-Röhrchen bis zur oberen Marke zu füllen.
Deshalb war es wichtig zu prüfen, wie sich die Abhängigkeit zwischen dem Hämatokritwert und der Länge der Blutsäule im Makrohämatokritverfahren gestaltete.
Es wurden von vier Versuchshunden mehrere WINTROBE-Röhrchen unterschiedlich hoch mit Blut gefüllt und gleichzeitig zentrifugiert. Dabei ergab sich:

1) $\bar{x}$ = 53,8 ± 0,61 n = 11 Blutsäule: 2,0 - 10,0 cm
2) $\bar{x}$ = 59,3 ± 0,85 n = 16 " : 2,7 - 10,0 "
3) $\bar{x}$ = 50,4 ± 0,71 n = 14 " : 2,0 - 10,0 "
4) $\bar{x}$ = 52,9 ± 0,62 n = 15 " : 2,0 - 10,0 "

Schon die etwa doppelt so große Streuung im Vergleich zu den ersten Versuchen mit dem WINTROBE-Hämatokrit läßt erkennen, daß der Einfluß der unterschiedlich langen Blutsäule von Bedeutung ist.

Um die Werte sämtlicher Hunde vergleichbar zu machen, wurde für jedes Tier der Hämatokritwert bei vorschriftsmäßiger Füllung (Marke 100) gleich 100 Prozent gesetzt. Die übrigen Hämatokritwerte desselben Blutes wurden darauf bezogen. Die Abhängigkeit des Hämatokritwertes von der Höhe der Erythrozytensäule ist in Abbildung 2 dargestellt.

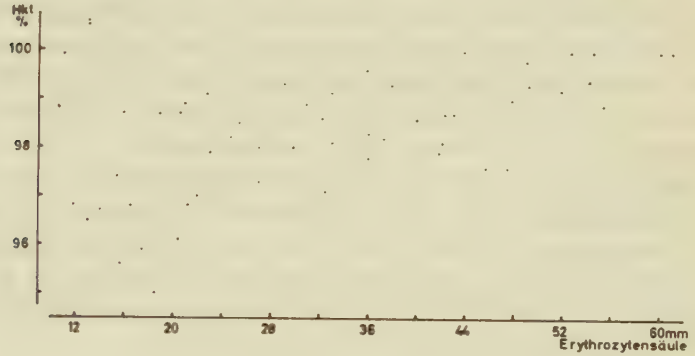

Abbildung 2 Abhängigkeit des Hämatokritwertes von der Füllung des Hämatokritröhrchens(WINTROBE)

Trotz der großen Streuung der Bezugspunkte ist im Bereich von etwa 24 bis 60 mm eine ansteigende Richtung des Punkteschwarmes mit längerer Erythrozytensäule deutlich. Bei einer geringeren Füllung der Röhrchen ist die Streuung wesentlich größer. Es ist jedoch auffällig, daß in diesem Bereich die meisten Punkte unterhalb von 97% liegen und damit tiefer, als es bei Fortsetzung der angedeuteten Richtung des Punkteschwarmes zu erwarten wäre.
Die Größe der Streuung dieser Versuche war der Anlaß, weitere Möglichkeiten, die von Einfluß auf den Hämatokritwert sein können, näher zu untersuchen. Hier mußte an erster Stelle an die osmotischen Veränderungen gedacht werden, die die Erythrozyten erfahren können. Von zwei Blutproben wurden je zwei Hämatokritröhrchen sofort nach der Blutentnahme zentrifugiert. Der Rest der Proben wurde bei Zimmertemperatur zwei Stunden aufbewahrt. Danach wurde von diesem Blut abermals der Hämatokritversuch angesetzt.

Nach zwei Stunden waren die Hämatokritwerte stets etwas höher als im ersten Versuch (+0,9;+0,7;+0,4;+0,7). Die Differenzen liegen zwar noch innerhalb des 2s-Bereiches des Methodenfehlers, sie dürften jedoch in der Tendenz als Ergebnis angesehen werden, da sie in sämtlichen Versuchen gleichgerichtet waren. Hinzu kommt,daß in allen Proben des zweiten Versuches stärkere Hämolyse auftrat. Sie ist ein Zeichen dafür, daß eine Quellung der Erythrozyten, die einer Hämolyse voraufgeht, tatsächlich stattgefunden hat. Der Anstieg des Hämatokrit trotz des Ausfalles von Erythrozyten durch Hämolyse macht die gefundene Differenz, obwohl sie relativ klein ist, bemerkenswert.
Unter Ausnutzung der im vorstehenden Versuch gewonnenen Erfahrung wurde eine Untersuchung mit abgestufter Füllung der Hämatokritröhrchen wiederholt. Das Verfahren wurde insofern verändert, als das Blut von der Entnahme aus der Vene bis zur Zentrifugation in einem Wasserbad gekühlt wurde, dem Eisstücke zugesetzt waren.

Tabelle 4

	Blutsäule (mm)	Erythrozytensäule (mm)	Hämatokrit
Wittpot	100,0	65,8	65,8
	80,5	52,0	64,6
	60,7	38,7	63,8
	41,2	26,2	63,6
	21,3	13,3	62,4
Rolf	100,0	62,0	62,0
	80,5	49,3	61,2
	61,2	37,2	60,8
	41,2	24,8	60,2
	21,4	13,0	60,7
Toni I	100,0	61,1	61,1
	81,6	49,0	60,0
	61,1	36,4	59,6
	40,7	24,0	59,0
	20,8	12,3	59,1
Toni II	100,0	63,9	63,9
	80,8	50,6	62,6
	61,0	37,9	62,1
	41,2	25,5	61,9
	20,4	12,5	61,3

Die graphische Darstellung zeigt eine wesentlich geringere Streuung der Bezugspunkte. Wie im vorangegangenen Versuch ist die Streuung bei einer geringeren Länge der Erythro-

zytensäule besonders hoch. Die Tendenz der mit der Erythrozytensäule steigenden Hämatokritwerte ist deutlich.

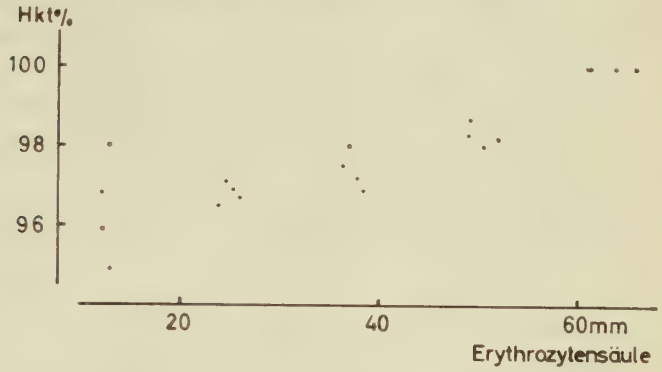

Abbildung 3 Abhängigkeit des Hämatokritwertes von der Füllung des Hämatokritröhrchens(WINTROBE) Blut gekühlt

Um den Einfluß verschiedener gebräuchlicher Antikoagulantien auf den Ausfall des Hämatokritwertes näher zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsserie durchgeführt. Als Antikoagulantien kamen Heparin, EDTA und Doppeltoxalat (nach HELLER und PAUL) zur Anwendung. Die Antikoagulantien wurden den Röhrchen, in welchen das Blut aufgefangen wurde, in der vorgeschriebenen Menge zugegeben und jeweils ein Hämatokrit sofort nach der Blutentnahme, ein weiterer zwei Stunden später angesetzt.
In der ersten Versuchsreihe (sofort angesetzter Hämatokritversuch) ergab sich zwischen Heparin und EDTA kein signifikanter Unterschied.
Das Doppeltoxalat lieferte gegenüber den beiden anderen Antikoagulantien signifikant niedrigere Hämatokritwerte (Heparin - Doppeltoxalat: $\bar{d} = -1{,}45$; $p < 0{,}05$).
Die selbe Tendenz zeigte der Versuch nach zwei Stunden, jedoch war die Standardabweichung so groß, daß die Unterschiede nicht mehr signifikant waren.

Tabelle 5

		Hämatokrit sofort	Hämatokrit nach 2 Stunden
Adda			
	Heparin	56,6	56,9
	EDTA	56,2	54,8
	D.-Oxalat	54,2	55,0
Anka			
	Heparin	53,8	53,9
	EDTA	52,0	52,0
	D.-Oxalat	52,1	52,2
Strolch			
	Heparin	53,5	54,0
	EDTA	53,6	53,9
	D.-Oxalat	52,0	53,6
Dago			
	Heparin	59,1	59,8
	EDTA	59,1	60,0
	D.-Oxalat	57,0	57,5
Rolf			
	Heparin	52,4	53,0
	EDTA	53,0	52,8
	D.-Oxalat	51,0	51,6
Jule			
	Heparin	45,9	46,7
	EDTA	47,0	47,6
	D.-Oxalat	46,1	47,6

Anmerkung zu Tabelle 5: nach 2 Stunden trat allgemein Hämolyse auf

Die dargestellten Untersuchungen über die Fehlerbreite der für die Berechnung des MCHC-Wertes maßgeblichen Methoden der Hämoglobin- und der Hämatokritbestimmung lassen erkennen:

Die Hämoglobinbestimmung war bei etwa normalen Hämoglobinwert mit einer Standardabweichung $\pm$ 0,3 behaftet. Bei niedrigem Hämoglobinwert nahm der Fehler absolut ab. Am Variabilitätskoeffizienten zeigte sich jedoch, daß er im Ver-

hältnis zur Größe des gemessenen Hämoglobinwertes annähernd gleich blieb. Das Mikrohämatokritverfahren in der hier aus technischer Notwendigkeit angewandten Weise hatte im günstigsten Falle einen Fehler von 0,74% des Hämatokritwertes und schied damit als Grundlage für die Berechnung des MCHC-Wertes aus. Das Hämatokritverfahren nach WINTROBE war unter den gegebenen Bedingungen vorzuziehen. Die Standardabweichung lag bei 0,33 für annähernd normale Hämatokritwerte, bei 0,16 für Hämatokritwerte um 5%. Da auf der Mensur des WINTROBE-Röhrchens die erste Kommastelle bereits geschätzt werden muß, ist der Fehler bei niedrigen Hämatokritwerten relativ groß.

Bei diesem Umfang der methodisch bedingten Fehlerbreite läßt sich die Auswirkung auf das Ergebnis der Berechnung des MCHC-Wertes abschätzen. Unter Verwendung von 2s ergäbe sich für einen Hämatokrit von 50% bei einem Hämoglobinwert von 17 g% eine Maximaldifferenz des MCHC-Wertes von $d_{max} = 3,58$, bei einem Hämatokritwert von 5% und einem Hämoglobinwert von 1,7 g% sogar eine Maximaldifferenz von $d_{max} = 6,6$. Eine derartige Streuung des MCHC-Wertes erstreckt sich praktisch über die gesamte Wertskala, die bei gesunden Hunden gefunden wird.

Daher wurde die Frage geprüft, ob es überhaupt möglich ist, durch Änderung des Milieus Erythrozyten auf MCHC-Werte zu bringen, die um mehr als den 2s-Bereich differieren.

Dazu wurde in Proben ei es Blutes das Plasma durch Salzlösungen unterschiedlicher Konzentration ersetzt. Im einzelnen wurde der Versuch folgendermaßen durchgeführt:

Ein Teil einer Blutprobe wird in üblicher Weise zur Bestimmung des MCHC-Wertes benutzt (Makrohämatokritfüllung bis 100, Hämoglobinbestimmung). Der Rest der Probe wurde zentrifugiert und das Plasma abgehebert. Der Erythrozytenbrei wurde gründlich durchmischt, um eine etwaige Schichtung der Erythrozyten nach dem spezifischen Gewicht zu beseitigen. Danach wurde der Erythrozytenbrei, der nur wenig Plasma enthielt, auf zwölf Röhrchen verteilt und jedem Röhrchen eine Kochsalzlösung zugesetzt. Die NaCl-Lösungen umfaßten einen Bereich von 0,4% bis 1,5% und waren um 0,1% abgestuft. Die Mischung von Blutkörperchenbrei und Salzlö-

sung erfolgte im Verhältnis 1:1. Nach 20 Minuten wurden diese Blutproben einer Hämatokrit- und Hämoglobinbestimmung unterzogen.Für jede Probe wurde der MCHC-Wert berechnet.In dieser Weise wurden Versuche mit 8 Hunden angestellt(Tab.6).

Tabelle 6

	Dago	Toni I	Adda	Anka
	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC
Normal-blut	34,4	35,2	34,3	35,8
Salzlsg. in %				
1,5	40,1	38,4	39,4	38,8
1,4	37,9	38,0	38,2	38,0
1,3	36,5	36,8	37,5	36,0
1,2	35,4	36,9	36,1	35,7
1,1	33,9	35,3	35,2	34,9
1,0	33,7	33,4	33,4	34,1
0,9	33,0	33,0	32,0	32,8
0,8	32,2	31,8	30,8	31,8
0,7	31,1	31,2	30,7	30,5
0,6	28,4	30,0	28,7	28,9
0,5	28,2	28,0+	26,7	27,9+
0,4	27,2+++	28,1+++	25,6+++	26,2+++

	Toni II	Wittpot	Bärbel	Betzi	ToniII
	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC
Normal-blut	35,2	34,8	34,6	35,0	35,4
Salzlsg. in %					
1,5	37,0	39,5	37,8	39,1	38,0
1,4	38,8	37,2	35,6	37,5	38,1
1,3	36,9	37,5	35,5	36,4	37,8
1,2	37,3	37,8	35,2	35,1	37,0
1,1	38,4	35,0	34,4	33,9	35,1
1,0	35,3	33,8	34,4	34,3	34,6
0,9	33,3	32,7	33,0	33,9	33,8
0,8	32,0	31,5	31,7	31,6	31,8
0,7	30,6	30,2	30,4	30,5	31,3
0,6	29,6	28,6	29,0	29,5	30,4
0,5	28,8	27,3+	27,5	28,3	27,9
0,4	27,3+++	26,6+++	26,6++	26,3+++	26,5+++

Anmerkung: Hämolyse durch + gekennzeichnet

Um die Ergebnisse der verschiedenen Hundeversuchsserien vergleichen zu können, wurde für jeden Hund der MCHC-Wert des unbehandelten Blutes gleich 100 Prozent gesetzt, und die durch den Versuch ermittelten MCHC-Werte darauf bezogen (Abbildung 4).

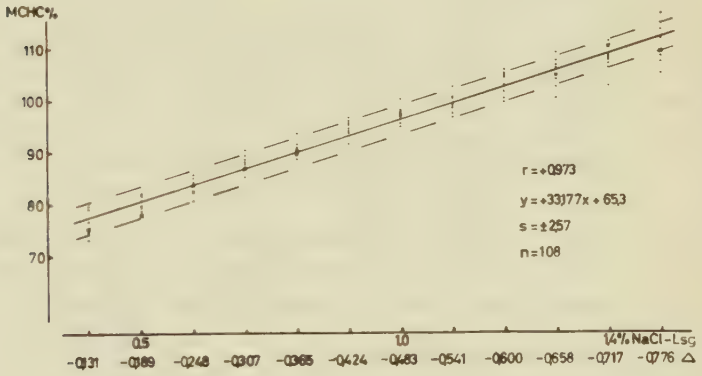

Abbildung 4 Verhalten des MCHC-Wertes bei Ersatz des Plasmas durch unterschiedlich konzentrierte Salzlösungen

Es ergab sich eine etwa lineare Zunahme der MCHC-Werte mit steigender Salzkonzentration.
Es ist bemerkenswert, daß eine Parallele zur Abszisse durch den 100% MCHC-Wert die Regressionsgerade etwa über dem Abszissenwert 1,1 schneidet. Danach müßte eine 1,1%ige NaCl-Lösung für den Hund als physiologisch angesehen werden.
Auch der gegenteilige Effekt wurde geprüft, indem in einer weiteren Versuchsreihe dem Plasma Aqua dest. in steigender Menge zugesetzt wurde.
Vorversuche ergaben, daß ein direkter Wasserzusatz in die Blutprobe sofort Hämolyse hervorruft. Deshalb wurde auch in dieser Versuchsreihe das Plasma nach dem Zentrifugieren zunächst abgehebert, dann mit der gewünschten Menge Wasser versetzt und dem Erythrozytenbrei wieder zugegeben. Der Betrag des zugesetzten Wassers pro 0,5 ml Plasma ist dem Versuchsprotokoll (Tabelle 7) zu entnehmen.

Tabelle 7

	Strolch	Toni I	Toni I	Adda	Anka
	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC
Normal-blut	35,8	35,4	35,1	34,5	35,8
Wasser in ml pro 0,5 ml Plasma					
0,003		33,4			
0,005		35,4	34,8		
0,01	35,5	34,1	34,9	34,7	39,7
0,02	34,0	34,4	34,3	33,8	35,0
0,03	33,5	34,2	34,1	33,4	
0,04	32,6	35,2	33,6	33,3	32,9
0,05	33,4	35,4	34,1	32,8	
0,06	32,3	34,6	32,7	31,4	34,4
0,07		35,5	35,4	32,0	
0,08		32,5	32,3	31,7	32,9
0,09		33,5	32,2	31,7	
0,10		34,0	33,1	31,5	33,9
0,12				31,6	38,2
0,14				30,3	33,2
0,16				30,5	31,1
0,18					29,9
0,20					31,2
0,22					29,3
0,24					29,8
0,26					29,2
0,28					28,7
0,30					29,0
0,35					29,2
0,40					26,5

	Anka	Toni II	Wittpot	Bärbel	Betzi
	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC	MCHC
Normal-blut	34,6	35,1	33,5	34,9	34,1
Wasser in ml pro 0,5 ml Plasma					
0,02	36,1	36,2	34,2	33,6	34,0
0,04	34,3	34,6	34,0	33,0	34,3
0,06	34,9	33,2	33,3	32,5	32,5
0,08	32,7	33,5	33,1	32,8	33,2
0,10	32,1	32,6	32,1	30,1	32,3
0,12	31,0	32,6	32,1	30,1	31,6
0,14	31,0	32,7	31,2	29,7	31,5
0,16	31,7	31,6	31,3	30,6	31,9
0,18	31,3	30,3	31,3	29,7	31,6
0,20	31,8	31,1	30,8	29,6	29,8
0,22	29,7	30,3	31,0	29,4	29,7
0,24	29,9	31,4	29,3	29,2	28,9
0,26	28,5	29,2	30,6		28,6
0,28	28,5	28,3	30,6		28,1
0,30	28,0	27,3	31,3		27,5
0,45	26,6+				
0,50	26,0+				

Anmerkung: + Hämolyse

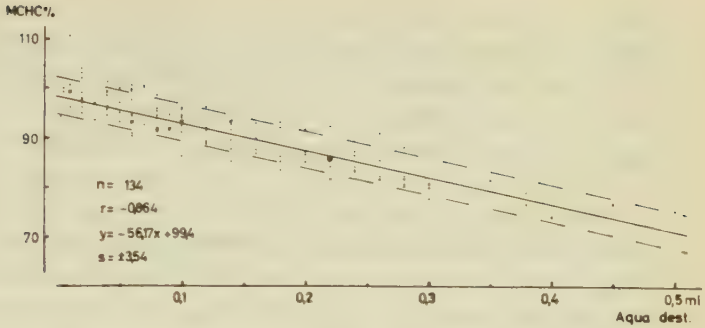

Abbildung 5 Verhalten des MCHC-Wertes bei Blutverdünnung mit Wasser

Die Abbildung 5 zeigt eine annähernd lineare Abnahme des MCHC-Wertes mit steigendem Wasserzusatz.
Die Versuche mit Plasmaersatz durch Salzlösungen bzw. Plasmaverdünnung mit Aqua dest zeigen, daß sich MCHC-Werte durch Änderung des Milieus willkürlich erzeugen lassen. Bei einem Salzgehalt unter 0,7% kam es zur Hämolyse. Bei der stärksten der verwendeten Salzkonzentrationen von 1,5% trat noch keine Hämolyse auf. Die MCHC-Werte im nichthämolysierten Blut umfassen einen Bereich von 26,7% (Ersatz des Plasmas durch eine 0,5%ige Kochsalzlösung) bis 40,1% (1,5%ige Kochsalzlösung).
Die enge Korrelation des MCHC-Wertes mit den osmotischen Verhältnissen ließ es möglich erscheinen, daß auch im Blut, wenn auch hier nicht so extreme Bedingungen vorliegen wie in den vorhergehenden Versuchen, eine Abhängigkeit des MCHC-Wertes vom osmotischen Druck des Plasmas nachweisbar sein würde. Zu seiner Messung wurde die Gefrierpunktserniedrigung angewendet. Zunächst wurde die Gefrierpunktserniedrigung für jede der verwendeten Salzlösungen bestimmt.
Die Abbildung 6 zeigt die erwartungsgemäß streng lineare Abhängigkeit. Auf der Abbildung 4 ist die Gefrierpunktserniedrigung auf der Abszisse miteingetragen.

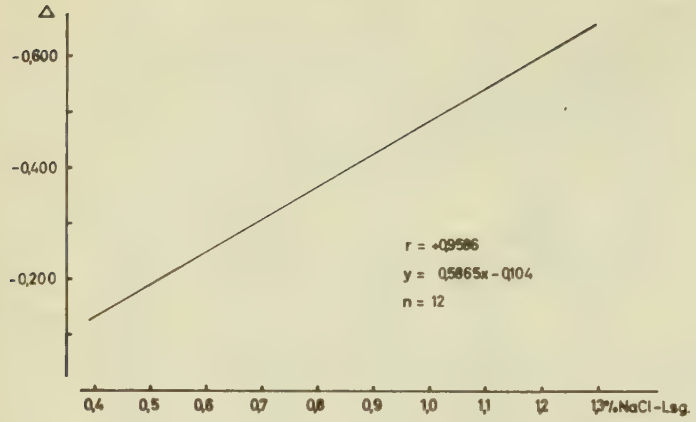

Abbildung 6 Die Beziehung zwischen der Gefrierpunktserniedrigung und unterschiedlich konzentrierten Salzlösungen

Um festzustellen, ob auch unter physiologischen Bedingungen eine Abhängigkeit zwischen dem MCHC-Wert und dem osmotischen Druck des Plasmas besteht, wurden 52 Blutproben von poliklinischen Patienten wahllos herausgegriffen. Von ihnen wurden der MCHC-Wert sowie die Gefrierpunktserniedrigung im Plasma bestimmt. In diesem Untersuchungsgut erstreckten sich die Werte für die Gefrierpunktserniedrigung von = -0,441 bis = -0,585°C. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in der Abbildung 7 dargestellt.

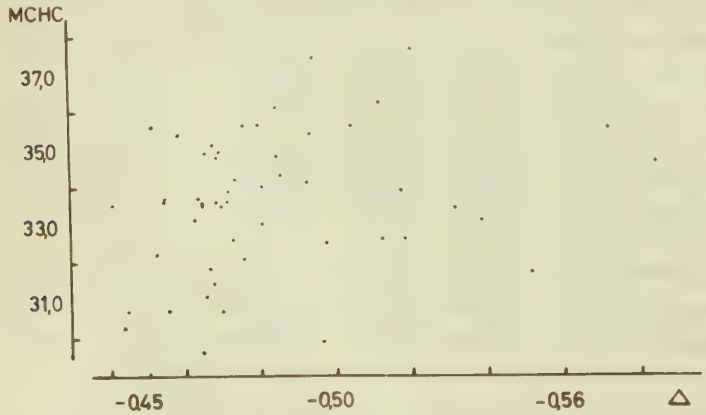

Abbildung 7 Der MCHC-wert und die Gefrierpunktserniedrigung

Eine statistisch gesicherte Abhängigkeit ergab sich nicht. Damit ist nicht gesagt, daß zwischen dem MCHC-Wert und der Gefrierpunktserniedrigung kein Zusammenhang besteht. Die individuellen Unterschiede im MCHC-Wert der einzelnen Probanden können die Abhängigkeit von der Gefrierpunktserniedrigung überdecken.

Nach den durchgeführten Untersuchungen wird der größte Einfluß auf den MCHC-Wert von den Ergebnissen der Hämatokritbestimmung ausgeübt. Dabei spielt die Länge der Blutsäule die entscheidende Rolle. Auch bei gleichlangen Blutsäulen macht sich eine erhebliche Streuung bemerkbar, für die das osmotische Verhalten der Erythrozyten verantwortlich sein kann.

Aus diesem Grunde wurden nochmals Versuche angesetzt mit künstlich gemischten Bluten. indem zu dem Originalblut unterschiedliche Mengen von Eigenplasma zugesetzt wurden. Die Blutproben wurden von dem Moment des Blutentzuges aus der Vene bis zum Beginn der Zentrifugierung gekühlt.

Da in den früheren Versuchen sehr niedrige Hämatokritwerte nicht eingestellt wurden, nahmen die folgenden Untersuchungen hierauf besondere Rücksicht. Das Blut wurde durch Zumischung von Eigenplasma auf die gewünschten Hämatokritwerte eingestellt, indem die Beziehung

$$\frac{\text{Ausgangshämatokrit}}{\text{erwünschten Hkt}} = \text{erforderliche Plasmamenge minus 1}$$

zugrunde gelegt wurde.

Als Beispiel einer solchen Verdünnungsreihe diene folgende Tabelle 8, für die der Ausgangshämatokrit 55 betrug.

Tabelle 8

erwünschter Hkt	ml Plasma	erwünschter Hkt	ml Plasma
53	0,04	27	1,04
51	0,08	25	1,20
49	0,12	23	1,39
47	0,17	21	1,62
45	0,22	19	1,89
43	0,28	17	2,24
41	0,34	15	2,67
39	0,41	13	3,23
37	0,49	11	4,00
35	0,57	9	5,11
33	0,67	7	6,86
31	0,77	5	11,00
29	0,90	3	18,30

In dieser Weise wurden Verdünnungsreihen von acht Hunden angesetzt, und aus jeder Blutprobe über den Hämoglobin- und den Hämatokritwert der MCHC-Wert bestimmt. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde auf den Einzeldarstellungen der Versuche der Wert des MCHC für 50% Hämatokrit aufgesucht, bzw. durch Verbindung der unmittelbar benachbarten Werte bestimmt.
Der MCHC-Wert der einzelnen Versuchsreihen bei 50% Hämatokrit wurde gleich 100% gesetzt. Die übrigen Werte jeder Versuchsreihe wurden auf diesen Wert bezogen. In Abbildung 8 ist das ist das Versuchsergebnis dargestellt. Anstelle der Originalbezugspunkte sind der Anschaulichkeit halber nur Punkte eingetragen, die als Mittelwerte aus jenen gewonnen wurden.

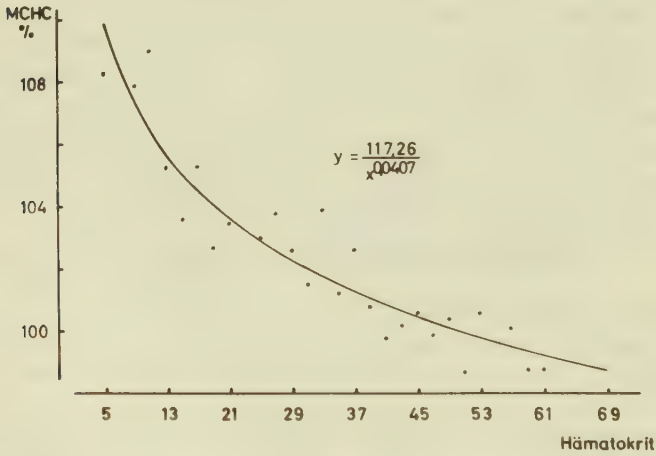

Abbildung 8 Abhängigkeit des MCHC-Wertes vom Hämatokrit (MCHC-Wert bei Hkt_{50} = 100%)

Die so erhaltenen Punkte zeigen eine deutliche Abhängigkeit, die jedoch nicht geradlinig verläuft. Über den niedrigen Hämatokritwerten ist der Kurvenverlauf steiler als über höheren. MCHC-Werte, die von Blut mit verschieden hohen Hämatokritwerten stammen, können nur verglichen werden, wenn sie auf einen bestimmten Hämatokritwert bezogen

bezogen sind. Als Bezugswert wurde hier der Hämatokrit 50% gewählt. Eine brauchbare Anpassung an den dargestellten Punkteschwarm besitzt eine Kurve des Typs

$$y = \frac{117,26}{x^{0,0407}} .$$

Daraus wurde eine Korrekturtafel berechnet. Sämtliche im folgenden angegebenen MCHC-Werte sind nach dieser Tafel auf einen Hämatokritwert von 50% korrigiert.

Tabelle 9

Korrekturtabelle

Hämatokrit	Faktor	Hämatokrit	Faktor
5	0,9106	38	0,9891
6	0,9173	39	0,9901
7	0,9229	40	0,9911
8	0,9279	41	0,9921
9	0,9325	42	0,9930
10	0,9363	43	0,9940
11	0,9400	44	0,9950
12	0,9436	45	0,9960
13	0,9464	46	0,9970
14	0,9492	47	0,9980
15	0,9522	48	0,9990
16	0,9543	49	0,9990
17	0,9570	50	1,0000
18	0,9589	51	1,0010
19	0,9614	52	1,0016
20	0,9634	53	1,0020
21	0,9653	54	1,0031
22	0,9672	55	1,0031
23	0,9688	56	1,0046
24	0,9706	57	1,0053
25	0,9722	58	1,0060
26	0,9738	59	1,0067
27	0,9752	60	1,0075
28	0,9766	61	1,0081
29	0,9785	62	1,0088
30	0,9794	63	1,0095
31	0,9804	64	1,0101
32	0,9823	65	1,0107
33	0,9833	66	1,0113
34	0,9843	67	1,0119
35	0,9852	68	1,0126
36	0,9862	69	1,0132
37	0,9881	70	1,0138

Nachdem eine solche Korrekturmöglichkeit geschaffen war, wurden erneut Versuche unternommen, um den MCHC-Wert in den einzelnen Schichten des Blutes nach der Zentrifugierung zu bestimmen.

Um zu prüfen, ob es prinzipiell möglich ist, Blutkörperchen

verschiedenen spezifischen Gewichtes nach dem Zentrifugieren am MCHC-Wert zu unterscheiden, wurden in einem Vorversuch Erythrozyten durch Salzzusatz ins Blut künstlich schwer gemacht. Nach Zumischung von unbehandelten Erythrozyten wurde zentrifugiert. Danach wurde die oberste und die unterste Erythrozytenschicht entnommen, mit Eigenplasma versetzt und für jedes so entstandene „Schichtblut" der MCHC-Wert über die Hämoglobin- und die Hämatokritbestimmung berechnet.

Im einzelnen wurde der Versuch wie folgt durchgeführt: Von einer Blutprobe wurde der MCHC-Wert wie üblich bestimmt. Ferner wurden zwei ml dieses Blutes in einem Reagenzglas zentrifugiert, das Plasma danach abgehebert und ihm fünf mg NaCl zugesetzt. Dieses hypertonische Plasma wurde dem Erythrozytenbrei wieder zugegeben und beides sorgfältig gemischt. Wird Kochsalz dem Blut unmittelbar zugesetzt, so trüt Hämolyse auf. Dieses „Salzblut" wurde nach etwa 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma entfernt und durch unbehandeltes ersetzt. Außerdem wurden 2 ml eines Normalblutes zugegeben. Nun wurde zentrifugiert, das Plasma verworfen und aus der im Reagenzglas verbliebenen Erythrozytensäule etwa 0,8 ml der obersten (B) und 0,8 ml von der untersten Schicht (A) entnommen. Aus jeder Schicht wurde eine neue Blutmischung durch Zusatz von Eigenplasma hergestellt. Während der gesamten Untersuchung wurde das Blut gekühlt (Wasserbad mit Eisstücken) und die Behandlungszeit möglichst kurz gestaltet.

Ergebnis:

	MCHC-Wert
Normalblut	34,9
Blut mit Salz	38,9
Schichtblut B	33,6
Schichtblut A	35,6

Ein weiterer Versuch wurde insofern variiert, als zu 2 ml Blut nicht Salz, sondern Aqua dest.(0,03 ml) zugesetzt wurden. Der Versuchsablauf glich im übrigen dem des vorhergehenden.

Ergebnis:

	MCHC-Wert
Normalblut	34,9
Blut mit Wasserzusatz	33,2
Schichtblut B	34,2
Schichtblut A	35,7

In beiden Versuchen ergab sich ein Unterschied im MCHC-Wert der Erythrozyten aus der oberen und der unteren Schicht. Danach schien der MCHC-Wert unter den angewandten Versuchsbedingungen als Maß für das spezifische Gewicht verwertbar.

Bei den folgenden Versuchen sollte der MCHC-Wert zur Untersuchung des spezifischen Gewichtes der Erythrozyten im Hämatokrit eines Normalblutes herangezogen werden. Zur Abkürzung der Versuchszeit wurde, um osmotische Veränderungen der Erythrozyten möglichst zu verhindern, von jeder zentrifugierten Blutprobe nur die oberste, die mittlere und die unterste Erythrozytenschicht zur Weiterbehandlung verwendet. Alle Proben wurden in Eiswasser gekühlt, solange sie nicht in der Zentrifuge waren. Bei vier Hunden wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Tabelle 10

		Hämatokrit	MCHC
Toni II	Normalblut	59,0	31,9
	Schichtblut A	63,3	33,1
	" B	59,0	32,4
	" C	55,0	31,7
Anko	Normalblut	53,0	32,9
	Schichtblut A	56,7 +	33,9
	" B	54,4 +	32,8
	" C	53,6 +	32,0
Rolf	Normalblut	62,1	31,5
	Schichtblut A	61,7 +	33,7
	" B	61,6 +	32,9
	" C	58,0 +	32,4
Betzi	Normalblut	59,2	32,3
	Schichtblut A	63,0 +	33,2
	" B	52,8 +	32,7
	" C	57,5 +	31,8

Anmerkung zu Tabelle 10: Hämolyse bei +
Schichtblut A: unterste Schicht
" B: mittlere "
" C: oberste "

Um die von den vier Hunden gefundenen Ergebnisse vergleichbar zu machen, wurden die MCHC-Werte der untersten Schicht jeweils als 100 Prozent gesetzt, und die anderen Werte darauf bezogen (Abbildung 9).

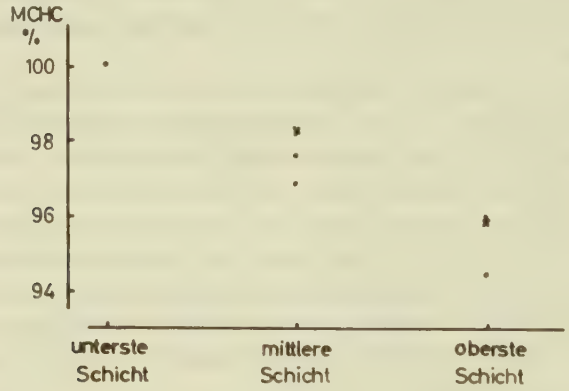

Abbildung 9 Das Verhalten des MCHC-Wertes innerhalb einer Erythrozytensäule

Die Differenz zwischen Unterschicht und Oberschicht ist deutlich. Die Werte, die sich für die Mittelschichten ergaben, liegen etwa auf der Hälfte dieser Differenz. Dafür spricht,daß die Abnahme des spezifischen Gewichtes der roten Blutkörperchen innerhalb der Erythrozytensäule annähernd linear erfolgt.

Besprechung

Die auf das Volumen des roten Blutkörperchens bezogene Hämoglobinkonzentration, der MCHC-Wert, bestimmt im wesentlichen das spezifische Gewicht des Erythrozyten.
Die mittlere Hämoglobinkonzentration der roten Blutkörperchen wird durch Umrechnung aus dem Hämoglobin- und dem Hämatokritwert der Blutprobe bestimmt. Es sollte festgestellt werden, ob die Erythrozytenpopulation eines Blutes sich aus Zellen unterschiedlichen spezifischen Gewichtes zusammensetzt.
Bekannt ist, daß sich im Blut des Hundes nach dem Zentrifugieren (Hämatokrit) oberhalb der meist gleichmäßig rot erscheinenden Erythrozytensäule in der Leukozytenschicht Erythrozyten befinden (NIEPAGE,1961), die durch eine blasse Anfärbung als hämoglobinarm gekennzeichnet sind. Die Frage, ob auch innerhalb der Erythrozytensäule eine Schichtung nach dem spezifischen Gewicht der roten Blutkörperchen stattfindet, sollte durch die Bestimmung des MCHC-Wertes für die einzelnen Schichten des zentrifugierten Blutes geprüft werden. Dafür mußten aus den Erythrozyten jeder einzelnen Schicht durch Zusatz von Plasma neue Blutproben angesetzt werden. An diesen war die Bestimmung des Hämoglobin- und des Hämatokritwertes durchzuführen, die die Grundlagen für die Berechnung des MCHC-Wertes bilden.
Da die ersten Versuche zeigten, daß die aus den Schichtblute n bestimmten MCHC-Werte eine unerwartet große Streuung aufwiesen, wurden die der Berechnung des MCHC-Wertes zugrunde liegenden Meßverfahren einer Prüfung unterzogen, um den methodischen Fehler zu erfassen und, soweit möglich Fehlerquellen abstellen zu können.
Während das angewandte Verfahren zur Messung des Hämoglobinwertes(Cyanhämiglobin-Methode)für hohe und niedrige Werte einen annähernd gleichen prozentualen Fehler von etwa 1,6% aufwies,war der Variabilitätskoeffizient beim WINTROBE-Hämatrokrit für Werte um 50% v = 0,6,für Werte um 5% dagegen v = 3,2.Die Hämatokritbestimmung wird also umso ungenauer,je geringer die Erythrozytenmenge in einer Blutprobe ist.Der Grund dafür liegt in der begrenzten Ablesegenauigkeit auf der Hämatokritskala,deren Teilstriche 1mm

(=1%) voneinander entfernt sind,so daß die erste Stelle nach dem Komma bereits geschätzt werden muß.Der dabei auftretende Fehler wirkt sich auf niedrige Hämatokritwerte prozentual stärker aus als auf hohe.
Das Mikrohämatokritverfahren,das wegen der geringen erforderlichen Blutmenge für die Untersuchung kleinerer Blutproben,wie sie bei der Untersuchung der anzusetzenden Schichtprobe anfallen können,besonders geeignet schien, hatte unter unseren technischen Bedingungen(11 cm lange Kapillaren bei 2400 U/Min.,bzw. 4,5 cm lange Kapillaren bei 10 000 U/Min.) einen Variabilitätskoeffizienten,der bei Werten um 50% nicht unter 2,3 lag.Für die späteren Versuche mußte das Mikrohämatokritverfahren deshalb ausgeschlossen werden.

Die Untersuchungen mit dem Mikrohämatokritverfahren ergaben ebenso wie die mit dem WINTROBE-Hämatokrit,daß die Plasmamenge,die nach der Zentrifugation noch in der Erythrozytenschicht des Hämatokrit zurückbleibt („trapped plasma"),berücksichtigt werden muß,wenn der Hämatokritwert zur Berechnung des MCHC-Wertes Verwendung finden soll.Dabei bestätigte sich,daß die zwischen den Erythrozyten verbleibende Menge an „trapped plasma" nicht linear verläuft.
Da für unsere Versuche das Verhältnis zwischen der Höhe des Hämatokritwertes und dem darin noch enthaltenen Plasmavolumen in seiner Auswirkung auf den MCHC-Wert wesentlich war,wurde durch mehrere Versuche der Verlauf dieser Abhängigkeit festgelegt.Er führte zu einem Kurvenzug,der in dem untersuchten Bereich von Hämatokrit 5 bis Hämatokrit 60 durch die Gleichung

$$y = \frac{117,26}{x^{0,0407}}$$

befriedigend beschrieben werden kann,wobei der Hämatokrit 50% als Bezugswert gleich 100 Prozent gesetzt wurde.Die Kurve verläuft im niedrigen Hämatokritbereich steiler als im höheren.Die empirisch gewonnene Kurve erlaubt die Aufstellung einer Korrekturtafel,die es ermöglicht,MCHC-Werte,die auf Grund unterschiedlicher Hämatokritwerte berechnet wurden,zu vergleichen,indem sie auf den Hämatokrit-

wert 50% bezogen werden.
Eine Fehlerquelle der Hämatokritbestimmung kann das osmotische Verhalten der Erythrozyten darstellen.In einer Blutprobe,die bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird,nehmen die roten Blutkörperchen allmählich Flüssigkeit auf bis es beim Überschreiten des des sogenannten kritischen Volumens zur Hämolyse kommt.Versuche mit dem WINTROBE-Hämatokrit ergaben für Blut,das zwei Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatte,eine Zunahme des Hämatokritwertes von 0,4 bis 0,9% bei gleichzeitiger Hämolyse.Es erwies sich daher als zweckmäßig,bei Versuchen zur Feststellung des MCHC-Wertes die Versuchszeit so kurz wie möglich zu halten und das Blut außerdem noch zu kühlen.Die Erwärmung innerhalb der Zentrifuge (28-29°C) konnte nicht unterbunden werden.

Der künstlichen Veränderung der osmotischen Verhältnisse im Blut durch Antikoagulantien muß besondere Beachtung geschenkt werden.In unseren Versuchen ergab sich kein wesentlicher Unterschied im Hämatokritwert bei Verwendung von Di-Na-EDTA(Titriplex III) und Heparin in der vorgeschriebenen Dosierung.Dagegen lieferte die Mischung von Kalium-Oxalat und Ammonium-Oxalat nach HELLER und PAUL signifikant um etwa 1,5% niedrigere Hämatokritwerte.Da die zu diesem Fragenkomplex bei der Besprechung des Schrifttums mitgeteilten Ergebnisse nicht am Hund gewonnen wurden, können sie mit unseren Resultaten nicht verglichen werden. Soweit nicht anders angegeben,wurden die eigenen Versuche mit heparinisiertem Blut durchgeführt.
Eine besondere Versuchsserie befaßte sich mit dem Einfluß, den der Ersatz des Blutplasmas durch abgestuft konzentrierte Salzlösungen und durch Verdünnung des Plasmas mit Aqua dest. auf den MCHC-Wert ausübt.Dies geschah vor allem um festzustellen,in welchem Umfang es möglich ist,durch Einflußnahme auf das osmotische Milieu des Blutes den MCHC-Wert zu manipulieren.In beiden Fällen ergab sich eine lineare Abhängigkeit des MCHC-Wertes von der Salzkonzentration der Suspensionsflüssigkeit.Dabei stellte sich heraus, daß der MCHC-Wert,den die unbehandelte Blutprobe geliefert hatte,sich wieder einstellte,wenn das Blutplasma durch ei-

ne 1,1%ige NaCl-Lösung ersetzt wurde.Danach müße in bezug auf die Erythrozyten eine 1,1%ige Kochsalzlösung für den Hund als physiologisch angesehen werden.In diesem Versuch konnten MCHC-Werte der Erythrozyten zwischen 26,7 und 40,1% ohne Hämolyse künstlich erzeugt werden.Diese Erfahrung steht im Widerspruch zu der SCHALM(1961),daß ein höherer MCHC-Wert als 35% nicht möglich sei.
Um zu prüfen ob auch in unbehandelten Blutproben eine Abhängigkeit zwischen dem MCHC-Wert und dem osmotischen Druck des Plasmas nachweisbar sei,wurde in wahllos aus dem Patientenbestand der Klinik entnommenen Blutproben der MCHC-Wert und die Gefrierpunktserniedrigung des Blutplasmas bestimmt.Eine signifikante Abhängigkeit war nicht nachweisbar,weil die individuelle Variation der MCHC-Werte zu groß ist.Wegen der engen Grenzen,in denen sich die Gefrierpunktserniedrigung im Plasma des Hundes bewegt,ist der Einfluß auf den MCHC-Wert als relativ gering anzusehen.
Für die abschließenden Untersuchungen zu Klärung der Frage, ob sich mit Hilfe des MCHC-Wertes Unterschiede im spezifischen Gewicht der Erythrozyten aus verschiedenen Schichten des Zentrifugates nachweisen lassen,wurden die gewonnenen Erfahrungen soweit wie möglich berücksichtigt.Um eine Abkürzung des Verfahrens zu erreichen,wurden nur Proben aus der obersten,der mittleren und der untersten Schicht der Erythrozytensäule zum Ansetzen der Blutproben verwendet.Das Blut wurde von der Abnahme bis zur Aufnahme in die Zentrifuge in Eiswasser gekühlt,die Ablesung der Hämatokritwerte erfolge mit der Lupe.Der Gehalt an „trapped plasma" wurde berücksichtigt,indem die MCHC-Werte auf einen Hämatokrit von 50% korrigiert wurden.Es ergab sich,daß die Erythrozyten der obersten Schicht einen niedrigeren MCHC-Wert hatten,als die der untersten Schicht.In der mittleren Schicht war der MCHC-Wert etwa um die Hälfte dieser Differenz niedriger als in der untersten Schicht.Danach scheint von unten nach oben eine etwa lineare Abnahme des MCHC-Wertes vorzuliegen.

Zusammenfassung

Der MCHC-Wert, die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten eines Blutes, wird aus dem Hämoglobinwert und dem Hämatokrit einer Blutprobe berechnet. Untersuchungen über die Fehlerbreite dieser beiden Verfahren ergaben für die Hämoglobinbestimmung als Cyanhämiglobin (Photometer Eppendorf) einen Variabilitätskoeffizienten von 1,6%, der bei hohen und niedrigen Hämoglobinwerten annähernd gleich war.

Die Hämatokritbestimmung nach WINTROBE lieferte demgegenüber für hohe Werte (etwa 50%) einen Fehler von 0,6%, für niedrige Werte (etwa 5%) jedoch einen prozentualen Fehler von 3,2. Deshalb ist der MCHC-Wert bei Anämien mit niedrigen Hämatokritwerten nur relativ unsicher zu erfassen.

Das Mikrohämatokritverfahren erwies sich in der angewandten Form als zu ungenau für die Bestimmung des MCHC-Wertes.

Die Menge des Blutplasmas, das sich nach dem Zentrifugieren zwischen den Erythrozyten befindet, ist abhängig von der Höhe der Erythrozytensäule. MCHC-Werte sind nur vergleichbar, wenn sie auf einen gleichen Hämatokritwert korrigiert sind. Aus Versuchen wurde eine Korrekturtafel abgeleitet, bei der ein Hämatokritwert von 50% als Bezugsgröße festgesetzt ist. Das osmotische Verhalten der Erythrozyten bedingt eine lineare Abhängigkeit des MCHC-Wertes vom Salzgehalt der Suspensionsflüssigkeit. Bei Ersatz des Plasmas einer Blutprobe durch eine 1,1 %ige NaCl-Lösung stellte sich der ursprüngliche MCHC-Wert wieder ein. Der MCHC-Wert der Erythrozyten konnte durch Zusatz von Kochsalz ins Blut bis auf 40% künstlich erhöht werden. Von den geprüften Antikoagulantien ergibt das Oxalatgemisch nach HELLER und PAUL (1934) um 1,5% niedrigere Hämatokritwerte als Heparin und Titriplex III, die zu einander gleichenden Hämatokritwerten führten. Der Vergleich von MCHC-Wert und Gefrierpunktserniedrigung im Blut von 52 Klinikpatienten ließ eine Abhängigkeit dieser Größen nicht deutlich werden.

Die Anordnung der Erythrozyten eines Blutes nach dem spezi-

fischen Gewicht beim Zentrifugieren konnte an der Abnahme des MCHC-Wertes vom Boden des Röhrchens zur oberen Erythrozytenschicht hin verfolgt werden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

Begemann,H. u. Harwerth,H.G. — Praktische Hämatologie Thieme, Stuttgart 1959

Billings,H.H. u. Brown,E.B.,jr. — Effect of splenectomy on changes in plasma by inhalation of 30% and 40% CO_2 in dogs Amer.J.Physiol. 180,363,1955

Chaplin,H.jr. u. Mollison,P.L. — Correktion for plasma trapped in the red cell column of the hematocrit Blood 7,1952,1227

Collins,D.A. u. Scott,F.H. — The freezing points of serum and corpuscles Biol.J.Chem.97,189,1932

Deubler,M.J. u. Cole,E.J. — The microhematocrit in the routine hematologic examination of dogs North Amer.Vet. 38,376,1957

Ebaugh,F.G.,jr., Levine,P. u. Emerson, Ch.P. — The amount of trapped plasma in the red cell mass of the hematocrit tube J.Laborat.Clin.Med. 46,409,1955

Hadley,G. u. Weiss,St.P. — Further notes on use of salts of Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) as anticoagulants Amer.J.Clin.Pathol. 25,1090,1955

Hedin,S.G. — Über die Brauchbarkeit der Centrifugalkraft für quantitative Blutuntersuchungen Pflügers Arch.Physiol.60,360,1895

Heller,V.G. u.Paul,H — Changes in cell volume produced by varying concentrations of different anticoagulants J.Laborat.Clin.Med.19,777,1934

Hlad,Ch.J.jr., u. Holmes,J.H. — Factors affecting hematocrit determination: trapped plasma,its amount and distribution J.Appl.Physiol.5,457,1953

Kwiatkowski,T. u. Rogowska,W. — Bemerkung zur Hämoglobinometrie Med.weteryn.18,502,1962

Leeson,D. u. Reeve,E.B. — The plasma in the packed cell column of the hematocrit J.Physiol.115,129,1951

Niepage,H. Zum Hämatokrit
Berl.Münch.tierärztl.Wschr.
74,475,1961

Richert,A. Vergleichende Bestimmung des Hämoglobingehaltes im Blut des Rindes als Hämatin mit dem Hämometer nach SAHLI bzw. ZEISS und als Cyanhämiglobin mit dem Unicam-Spektralphotometer
Hannover,Diss. 1962

Schalm,O.W. Veterinary Hematology
Lea & Febiger,Philadelphia 1961

Strumia,M.M.,Sample, A.B., u. Hart,El.D. An improved microhematocrit method
Amer.J.Clin.Pathol. 24,1016,1954

Weber,E. Grundriss der biologischen Statistik
Jena,Fischer 1961

Wintrobe,M.M. The size and hemoglobin content of the erythrocyte
J.Laborat.Clin.Med.26,899,1941

Wintrobe,M.M. Clinical Hematology
Philadelphia,Lea and Febiger 5.ed. 1963

Wintrobe,M.M. A simple and accurate hematocrit
J.Laborat.Clin.Med.
15,287,1929

Für die Überlassung des Themas un die Hilfe bei der Auswertung danke ich Herrn Priv.Doz. Dr. H.Niepage.
Herrn Dipl.-Kfm. H.Weiss möchte ich für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsergebnisse Dank sagen.
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Unterstützung mit Sachmitteln.

L e b e n s l a u f

Am 6.April 1940 wurde ich als dritter Sohn des Kaufmannes Otto Schulz und seiner Ehefrau Lieselotte in Potsdam-Babelsberg geboren.

Nach dem Schulbesuch in Babelsberg beabsichtigte ich,das Studium der Veterinärmedizin aufzunehmen.Um die Immatrikulationsbedingungen der Freien Universität Berlin zu erfüllen,legte ich im Juni 1959 in Berlin-Tiergarten eine Ergänzungsprüfung für das ein Jahr zuvor in der SBZ bestandene Abitur ab.

Im Wintersemester 1959/60 wurde ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität eingeschrieben, wechselte während des Studiums nicht die Universität und legte 1964 das Staatsexamen in Berlin ab.